

## Pengaruh Penghentian Monosodium Glutamat terhadap Jumlah Sel Leydig Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Dewasa

Lodi Salim<sup>1</sup>; Nawangsari<sup>2</sup>; Muhammad In'am Ilmiawan<sup>3</sup>; Sari Eka Pratiwi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Pendidikan Dokter, FK UNTAN

<sup>2</sup> Departemen Pre Klinik Histologi Medik, Program Studi Pendidikan Dokter, FK UNTAN

<sup>3</sup> Departemen Pre Klinik Biologi dan Patobiologi Medik, Program Studi Pendidikan Dokter, FK UNTAN

### Abstrak

**Latar Belakang.** Monosodium glutamat (MSG) merupakan bahan tambahan makanan yang berguna sebagai penyedap rasa yang dapat merusak sel leydig di jaringan testis. *Food and Drugs Administration* pada tahun 1995 telah menetapkan batas keamanan untuk penggunaan MSG yaitu tidak lebih 120 mg/kgBB/hari. Kerusakan sel leydig ditandai dengan inti sel yang piknotik, menjadi padat, berwarna lebih gelap dan batas sel tidak teratur. **Metodologi.** Penelitian ini merupakan eksperimental murni dengan rancangan *simple random sampling*. Kelompok kontrol (K) 1,2,3 diberikan aquadest selama 28 hari; kelompok perlakuan satu (P1) 1,2,3 diberikan MSG dosis 4 g/kgBB/hari selama 28 hari; kelompok perlakuan (P2) 1,2,3 diberikan MSG dosis 6 g/kgBB/hari selama 28 hari kemudian dihentikan (regenerasi) selama 1 hari, 28 hari, 56 hari. Kemudian dilakukan pembedahan dan pembuatan preparat jaringan testis dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin*. Variabel yang diukur adalah jumlah sel leydig dengan perbesaran lensa objektif 100 x dengan minyak emersi. Data dianalisa menggunakan uji one-way anova dilanjutkan dengan post hoc test LSD. **Hasil.** Analisis menunjukkan pada penghentian pajanan MSG hari ke-1 terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan satu ( $p=0,00$ ) dan dua ( $p=0,00$ ). Pada penghentian pajanan MSG hari ke-29 tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan satu ( $p=0,17$ ) dan dua ( $p=0,17$ ). Pada penghentian MSG hari ke 57 tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok satu ( $p=0,98$ ) dan dua ( $p=0,257$ ). **Kesimpulan.** Penghentian pemberian MSG menyebabkan terjadinya regenerasi sel leydig.

**Kata Kunci:** Monosodium Glutamat, Sel Leydig

### Abstract

**Background.** Monosodium glutamate (MSG) is a food additive that used as a flavor enhancers, but it can damages leydig cell in testis. *Food and Drugs Administration (FDA)* in 1995 has established the safety limit in the usage of MSG, no more than 120 mg/kgBW/day. Leydig cell damage characterized by picnotic nucleus, leydig cell border denser and darker with irregular cell boundary. **Method.** This research was a true experimental research with simple random sampling. The control group (K) 1,2,3 were given aquadest for 28 days. The first treatment group (P1) 1,2,3 were given MSG 4 g/kgBW/day for 28 days. The second treatment group (P2) 1,2,3 were given MSG 6 g/kgBW/day for 28 days and then stopped (regeneration) for 1 day, 28 days, and 56 days. Then, the rats were sacrificed and the testis was processed into microscopic preparations and stained with H&E. The measured variable in microscope including the number of leydig cell with 100x objective lens magnification using oil immersion. The data was analyzed using one-way anova, continued with post hoc test LSD. **Result.** Analysis showed that there was a significant difference between the control group and the first treatment group ( $p=0,00$ ) also the second treatment group ( $p=0,00$ ) in 1 day cessation of MSG exposure. There was no significant difference between the control group and the first treatment group ( $p=0,17$ ) also the second treatment group ( $p=0,17$ ) in 29 days cessation of MSG exposure. There was no significant difference between the control group and the first treatment group ( $p=0,98$ ) also the second treatment group ( $p=0,257$ ) in 57 days cessation of MSG exposure. **Conclusion.** Cessation of MSG exposure caused leydig cell regeneration.

**Keywords:** Monosodium Glutamate, Leydig Cell

## LATAR BELAKANG

Monosodium glutamat (MSG) merupakan bahan tambahan makanan yang berguna sebagai penyedap rasa dan telah digunakan di berbagai negara. Monosodium glutamat dapat ditemukan pada berbagai makanan kalengan maupun makanan siap saji pada makanan di rumah makan, rumah sakit, dan kafetaria.<sup>1-3</sup> Produksi MSG di dunia pada tahun 2010 mencapai 2.100.000 MT. Produksi MSG di beberapa negara diantaranya, Jepang 65.000 ton/tahun, Korea 40.000 ton/tahun, Amerika 20.000 ton/tahun dan Indonesia pada tahun 1977 sekitar 254.900 ton/tahun.<sup>1,2</sup> *World Health Organization* (WHO) dan *Food and Drugs Administration* (FDA) pada tahun 1995 telah menetapkan batas keamanan untuk penggunaan monosodium glutamat yaitu tidak lebih 120 mg/kgBB/hari.<sup>2</sup> Pada awalnya pemakaian MSG untuk penyedap rasa makanan di Jepang, Korea, Cina dan Thailand hanya sebanyak 30–60 mg/porsi, namun setelah harga MSG menjadi murah,

penggunaan MSG menjadi tidak wajar dan berlebihan termasuk di Indonesia dengan takaran 100–300 mg/porsi.<sup>3-5</sup>

Telah banyak penelitian yang dilaporkan mengenai efek buruk dari penggunaan MSG yang berlebihan diantaranya oleh Camihort *et al* (2004) dilaporkan bahwa pemberian MSG 4 mg/gBB pada bayi tikus betina usia 10 hari menyebabkan kerusakan nukleus arkuata di hipotalamus.<sup>6</sup> MSG juga dapat menyebabkan terjadinya peningkatan kadar  $\text{Ca}^{2+}$  dalam intrasel leydig, peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  akan menyebabkan gangguan pada mitokondria dan mengaktifkan enzim ATPase, phospholipases, endonuklease, dan protease sehingga terjadinya gangguan pada sintesis ATP dan gangguan pada permeabilitas membran sel sehingga pada akhirnya akan menyebabkan kematian pada sel leydig.<sup>7</sup>

## METODE

Penelitian ini merupakan studi *in vivo* dengan pendekatan eksperimental murni. Hewan uji yang digunakan sebagai subjek penelitian adalah tikus putih jantan dewasa galur *Sprague dawley*. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara *simple randomization* yaitu pengambilan sampel dengan cara mengambil anggota populasi yang tersedia secara acak. Penelitian ini dilaksanakan di Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura Pontianak pada bulan September 2016.

Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah Tikus putih jantan galur *Sprague dawley*, Umur 8 – 12 minggu, Berat badan 150 – 250 gr, Kondisi badan sehat (aktif dan tidak cacat secara anatomi). Kriteria eksklusi tikus sakit atau mati saat penelitian berlangsung.

Jumlah sampel dalam penelitian yang memenuhi kriteria inklusi adalah 27 ekor tikus. Instrumen penelitian yang digunakan adalah preparat histologi

jaringan testis tikus putih. Data dianalisis menggunakan uji parametric *One Way Anova*.

## HASIL

### Karakteristik Subjek Penelitian

Subjek penelitian merupakan sel leydig normal dan tidak normal pada jaringan testis. Sel leydig normal memiliki nukleus tunggal yang berbentuk bulat dan anak inti (nukleolus) yang gelap terletak di tengahnya dan sel leydig tidak normal ditandai dengan inti sel yang piknotik, menjadi padat, berwarna lebih gelap dan batas sel tidak teratur.

### Gambaran Histologi Sel Leydig

#### a. Gambaran Histologi Sel Leydig

##### Hari Ke-1 Pasca Penghentian

##### Perlakuan

Gambaran histologi sel leydig hari ke-1 terlihat pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan memiliki gambaran sel leydig yang normal dan rusak. Jumlah sel leydig yang normal kelompok kontrol

lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan

**b. Gambaran Histologi Sel Leydig Hari ke-29 Pasca penghentian perlakuan**

Gambar histologi sel leydig hari ke-29 pasca perlakuan terlihat pada kelompok perlakuan memiliki gambaran yang menyerupai kelompok kontrol yaitu didominasi oleh sel leydig normal. Jumlah sel leydig yang mengalami kerusakan pada kelompok perlakuan 1 lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 dan kelompok kontrol.

**c. Gambaran Histologi Sel Leydig Hari ke-57 Pasca Penghentian Perlakuan**

Gambar histologi sel leydig hari ke-57 pasca perlakuan terlihat pada kelompok perlakuan memiliki gambaran yang menyerupai kelompok kontrol yaitu didominasi oleh sel leydig normal. Jumlah sel leydig normal pada kelompok kontrol lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan.

**Analisis uji parametric *One Way Anova***

**1. Analisa Statistik Rerata Persentase Jumlah Sel Leydig Normal**

Bersasarkan penelitian ini, diperoleh hasil uji normalitas dan homogenitas varian didapatkan data terdistribusi normal ( $p>0,05$ ) dan variasi data normal ( $p>0,05$ ), sehingga data dikelola dengan uji parametrik ANOVA, dilanjutkan uji LSD. Analisis data dengan uji ANOVA menunjukkan paling tidak terdapat beberapa kelompok yang mempunyai perbedaan rerata persentase jumlah sel leydig normal yang bermakna pada kelompok penelitian ( $p<0,05$ ). Persentase rerata jumlah sel leydig dapat dilihat pada gambar 4.

Pada penghentian pajanan hari ke-1, terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pemberian MSG 4 g/kgBB ( $P=0,00$ ) dan 6 g/kgBB ( $P=0,00$ ), namun tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan pemberian MSG 4 g/kgBB

dengan pemberian MSG 6 g/kgBB ( $P=0,41$ ).

Pada penghentian pajanan hari ke-29, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pemberian MSG 4 g/kgBB ( $P=0,23$ ) dan 6 g/kgBB ( $P=0,17$ ), maupun tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan pemberian msg 4 g/kgBB dengan pemberian MSG 6 g/kgBB ( $P=0,90$ ).

Pada penghentian pajanan hari ke-57, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pemberian MSG 4 g/kgBB ( $P=0,981$ ) dan 6 g/kgBB ( $P=0,282$ ), maupun pada kelompok perlakuan pemberian MSG 4 g/kgBB dengan pemberian MSG 6 g/kgBB ( $P=2,93$ ).

## **2. Analisa Statistik Rerata Jumlah Sel Leydig Rusak**

Bersasarkan penelitian ini, diperoleh hasil uji normalitas dan homogenitas varian didapatkan data terdistribusi normal ( $p>0,05$ ) dan variasi data normal ( $p>0,05$ ),

sehingga data dikelolah dengan uji parametrik ANOVA, dilanjutkan uji LSD.

Analisis data dengan uji ANOVA menunjukkan paling tidak terdapat beberapa kelompok yang mempunyai perbedaan rerata jumlah sel leydig normal yang bermakna pada kelompok penelitian ( $p<0,05$ )

Pada penghentian pajanan hari ke-1, terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan pemberian MSG 4 g/kgBB ( $P=0,00$ ) dan kelompok perlakuan pemberian MSG 6 g/kgBB ( $P=0,00$ ), namun tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan pemberian msg 4 g/kgBB dengan kelompok perlakuan pemberian MSG 6 g/kgBB ( $P=0,384$ ).

Pada penghentian pajanan hari ke-29, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan pemberian MSG 4 g/kgBB ( $P=0,17$ ) dan 6 g/kgBB ( $P=0,12$ ), maupun pada kelompok perlakuan pemberian MSG

4 g/kgBB dengan pemberian msg 6 g/kgBB ( $P=0,887$ ).

Pada penghentian pajanan hari ke-57, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pemberian MSG 4 g/kgBB ( $P=0,98$ ) dan 6 g/kgBB ( $P=0,257$ ), maupun pada kelompok perlakuan pemberian MSG 4 g/kgBB dengan pemberian MSG 6 g/kgBB ( $P=0,267$ ).

## PEMBAHASAN

Pada penelitian ini diberikan perlakuan berupa pemberian MSG dengan dosis 4 g/kgBB dan 6 g/kgBB. Dosis yang diberikan ini setara dengan 224 g/kgBB dan 336 g/kgbb pada manusia dengan berat badan rata-rata 70 kg. Dosis ini merupakan dosis yang melebihi ambang batas aman yang ditetapkan oleh FDA yaitu 120 mg/kgBB pada manusia.<sup>2</sup> Pada penelitian ini bahwa telah terjadi kerusakan sel leydig yang diakibatkan eksitotoksisitas glutamate setelah pemberian MSG dengan dosis yang melebihi batas aman dan terjadi

regenerasi sel leydig setelah pajanan MSG diberikan.

Pengumpulan data dilakukan dengan menghitung jumlah sel leydig normal dan jumlah sel leydig rusak pada jaringan testis. Sel leydig normal memiliki ciri-ciri nukleus tunggal yang berbentuk bulat dan anak inti (nukleolus) yang gelap terletak ditengahnya sedangkan sel leydig yang rusak ditandai dengan ada nya nekrosis pada sel tersebut. Terdapat beberapa faktor dan mekanisme yang dapat berperan dalam proses kematian sel leydig termasuk peningkatan stress oksidatif, kerusakan sel akibat radikal bebas, gangguan fungsi mitokondria dan eksitotoksisitas glutamate.

Berdasarkan data statistik jumlah sel leydig normal pada kelompok perlakuan 1 dan 2, terlihat bahwa rerata jumlah sel leydig normal pada hari pertama pasca penghentian pemberian MSG lebih sedikit dibandingkan dengan hari ke 29 pasca penghentian pemberian MSG. Perbedaan rerata jumlah sel leydig normal pasca

penghentian pajanan MSG, hal ini disebabkan karena terjadinya regenerasi pada sel leydig. Penelitian yang dilakukan oleh michail (2004) mendapatkan hasil bawah sel leydig membutuhkan waktu selama 7 minggu untuk melakukan regenerasi secara sempurna pada percobaan dengan pemberian *ethanedimethane sulfonate* (EDS). Tahapan regenerasi sel leydig dimulai dari sel progenitor yang berbentuk *elongated spindle-shaped* dengan retikulum endoplasma halus dalam jumlah sedikit, ekspresi marker sel Leydig seperti  $3\beta$ -HSD, LH reseptor dan produksi androgen pada level yang rendah. Sel progenitor Leydig berubah bentuk dari *spindle-shaped* menjadi bulat, dan diikuti dengan retikulum endoplasma halus yang jumlahnya meningkat dan dikenal sebagai *immature Leydig cells*. Retikulum endoplasma halus merupakan tempat terjadinya proses steroidogenesis. Populasi sel Leydig meningkat dua kali lipat dari

hari ke 28-56 yang dikenal sebagai *Adult Leydig Cells* (ALC).<sup>8</sup>

Penggunaan MSG yang melebihi batas aman dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan peningkatan kalsium intrasel. Saat MSG masuk kedalam tubuh, MSG tersebut akan diubah menjadi ion natrium dan L-glutamat. Ketika L-glutamat dalam konsentrasi yang tinggi didalam pembuluh darah, maka ginjal akan berusaha untuk mengekresikannya. Konsentrasi yang berlebihan ini lah yang dapat mengaktifkan secara berlebihan reseptor-reseptor glutamate seperti NMDA,AMPA, dan reseptor metabotropic yang ada didalam testis. L-glutamat akan mengaktifkan reseptor AMPD menyebabkan masuknya natrium yang memicu depolarisasi sel yang akan mengakibatkan mangnesium keluar keluar dari reseptor NMDA sehingga kalsium masuk ke dalam sel sedangkan aktivasi mGluR menyebabkan pelepasan kalsium intrasel dari reticulum endoplasma. Selain itu, peningkatan kadar natrium juga dapt

meningkatkan kalsium intrasel melalui stimulus saluran natrium-kalsium. Depolarisasi yang terlaiki mengaktifkan kanal kalsium pada membrane dan menghambat pengembalian glutamate.<sup>9</sup>

Akumulasi kalsium yang terjadi ini dapat merusak mitokondria sehingga menyebabkan kematian sel. Protein proapoptosis memicu pelepasan sitokrom c dari mitokondria. Sitokrom c dengan protein apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf 1) menyatu dan mengaktifkan procaspase 9. Kompleks ini selanjutnya mengaktifkan caspase 9 dan caspase 3. Pembengkakan yang terjadi pada mitokondria disebabkan oleh peningkatan permeabilitas dari membrane mitokondria mengakibatkan protein mitokondria keluar ke sitoplasma. Protein mitokondria ini berikatan dengan inhibitor apoptosis proteins (IAP) sehingga protein ini menjadi bentuk yang tidak aktif. Aktivitas caspase 3 dalam fragmen DNA dan inhibisi IAP menyebabkan kematian sel.<sup>9</sup>

Berdasarkan uji statistic, kerusakan sel leydig yang paling tinggi terjadi pada kelompok yang mendapatkan MSG dengan dosis 4mg/kgBB. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Suryadi (2007), pemberian MSG selama 49 hari menyebabkan mengecilnya diameter inti dan menurunkan jumlah sel leydig. Hasil ini sejalan dengan Penelitian yang dilakukan oleh Aisha (2013) menunjukkan bahwa pemberian MSG 30 gram/ kg berat badan pada tikus putih jantan memberikan pengaruh peningkatan berat badan dan kerusakan pada tubulus seminiferus seperti hancurnya sel spermatogenik serta munculnya massa nekrosis pada sel germinal, hasil penelitian tersebut juga melaporkan bahwa terjadinya nekrosis pada sel leydig.

## **KESIMPULAN**

Penghentian pemberian MSG dapat menyebabkan terjadinya regenerasi pada sel leydig.



## DAFTAR PUSTAKA

1. Sukawan UY. Efek toksik monosodium glutamat pada binatang sutisning. 2008;3:306-14.
2. Ardiyanto TD. MSG dan kesehatan: sejarah, efek dan kontroversinya. INOVASI. 2004 Aug;16(1):52-6.
3. Sukmaningsih AA, Ermayanti IGAM, Wiratmini NI, Sudatri NW. Gangguan spermatogenesis setelah pemberian monosodium glutamat pada mencit (*Mus musculus L*). J Biol. 2011 Des;(2):15.
4. Anindita K, Sutyarso. Pengaruh pemberian vitamin C terhadap berat testis, jumlah sel leydig, dan diameter tubulus seminiferus mencit (*Mus musculus L*) jantan dewasa yang diinduksi monosodium glutamat. Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. 2012.
5. Farombi EO, Onyena OO. Monosodium glutamate induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E dan quercetin. Hum Exp Toxicol. 2006. 25:251-9.
6. Camihort G, Dumm C G, Luna G, Fersese C. Relathioship between pituitary and Adpdiposa Tissue after Hypothalamic Denervation in the famale rats. 2004 A morphometric immunohistochemical study. Cells Tissues Organs 179, 192–201
7. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell, R. Robbins. Basic pathology. Edisi 8. Philidelphia: W.B Saunders Company. 2010
8. Davidoff Michail S, middendorff R, Enikolopov G, Riethnacher D, Holstein Adolf F, Muller D. Progenitor cell of the testosterone-producing leydig cells revealed. The Journal of Cell Biology. 2004.
9. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Pharmacology range, dale's, Ed ke-7. Churcill Livingstone: Elsevier; 2011